

CARRIER FOR PROTEIN PURIFICATION, PRODUCTION METHOD THEREOF, AND PROTEIN PURIFICATION METHOD USING THE CARRIER

Publication number: JP2002249523

Publication date: 2002-09-06

Inventor: HOSHINO KAZUHIRO; KOMOTO KAZUAKI; TOKIWA YUTAKA; KITAGAWA MASARU;
RAKU TAKAO

Applicant: TOYO BOSEKI; KONAN CHEMICAL MFG; NAT INST OF ADV IND & TECHNOL; TOKIWA YUTAKA; HOSHINO KAZUHIRO

Classification:

- international: G01N30/88; B01D15/08; B01J20/26; B01J20/281; B01J20/30; C07K1/22; C08F218/14; C08F220/54; G01N30/00; B01D15/08; B01J20/22; B01J20/281; B01J20/30; C07K1/00; C08F218/00; C08F220/00; (IPC1-7): G01N30/48; C08F218/14; B01D15/08; B01J20/26; B01J20/30; C07K1/22; C08F220/54; G01N30/88

- european:

Application number: JP20010050144 20010226

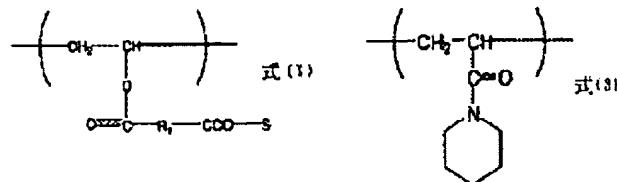
Priority number(s): JP20010050144 20010226

[View INPADOC patent family](#)

Report a data error here

Abstract of JP2002249523

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a temperature-sensitive polymer which has an affinity for a saccharide wherein a hydroxy group other than an anomeric hydroxy group is involved in bonding between saccharides or an affinity for a substance capable of recognizing a free anomeric hydroxy group, has a sugar ligand bonded to a polymer chain via a hydroxy group other than an anomeric hydroxy group, and has a cloud point at a lower temperature, a production method thereof, and a protein purification method using the polymer. **SOLUTION:** The temperature-sensitive polymer is a copolymer comprising structural units represented by formula (1) (wherein R₁ is a methylene or alkylene group; and S is a sugar residue formed by removing a hydroxy group other than an anomeric hydroxy group from a sugar compound) and structural units represented by formula (2).



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-249523

(P2002-249523A)

(43)公開日 平成14年9月6日 (2002.9.6)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 08 F 218/14		C 08 F 218/14	4 D 0 1 7
B 01 D 15/08		B 01 D 15/08	4 G 0 6 6
B 01 J 20/26		B 01 J 20/26	H 4 H 0 4 5
20/30		20/30	4 J 1 0 0
C 07 K 1/22		C 07 K 1/22	

審査請求 未請求 請求項の数 7 OL (全 10 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001-50144(P2001-50144)	(71)出願人 000003160 東洋紡績株式会社 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号
(22)出願日	平成13年2月26日 (2001.2.26)	(71)出願人 391043392 甲南化工株式会社 大阪府高槻市中川町5番21号
(出願人による申告) 国等の委託研究の成果に係る特許出願 (平成12年度、新エネルギー・産業技術総合開発機構、生体触媒を利用した再生可能資源からの高分子素材開発、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受けるもの)		(71)出願人 301021533 独立行政法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1 (74)代理人 100065215 弁理士 三枝 英二

最終頁に続く

(54)【発明の名称】蛋白質精製用担体、その製造方法及びそれを用いた蛋白質の精製方法

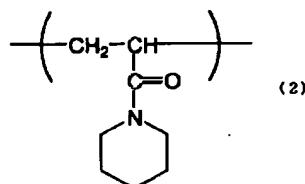
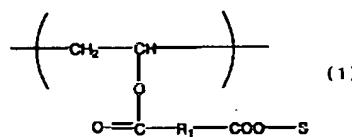
(57)【要約】

【課題】糖質間の結合の中でアノメリック水酸基以外の水酸基が結合に関係している糖質や遊離のアノメリック水酸基を認識する物質と親和性があり、アノメリック水酸基以外の水酸基を介して、ポリマー鎖に結合した構造の糖リガンドを有した、より低温に疎点を有する温度感受性ポリマー及びその製造方法とそれを利用した蛋白

質の精製方法を提供する

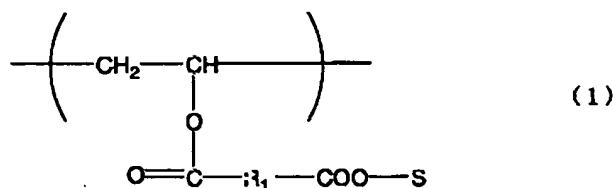
【解決手段】下記一般式(1) (式中、R₁はメチレン基又はアルキレン基、Sは糖化合物からアノメリック水酸基以外の1個の水酸基が除かれた糖残基を示す)で表される構造単位および下記一般式(2)で表される構造単位からなる共重合体。

【化1】



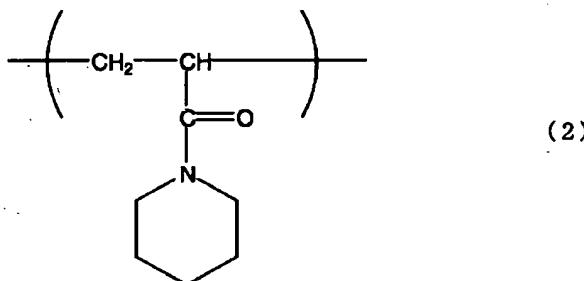
【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)



(式中、R₁はメチレン基又はアルキレン基、Sは糖化合物からアノメリック水酸基以外の1個の水酸基が除かれた糖残基を示す)で表される構造単位および下記一般式(2)

【化2】



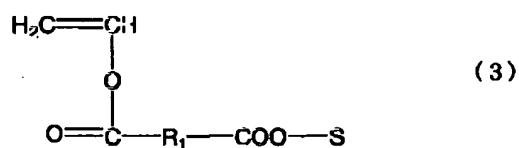
で表される構造単位からなる共重合体。

【請求項2】 一般式(1)で表される構造単位を0.01~99.99モル%、及び一般式(2)で表される構造単位を99.99~0.01モル%含有する請求項1に記載の共重合体。

【請求項3】 一般式(1)中の糖化合物が、单糖類、オリゴ糖類、多糖類及びその部分加水分解物並びにそれらの誘導体から選択される化合物である、請求項1又は2に記載の共重合体。

【請求項4】 下記一般式(3)の化合物

【化3】



(式中、R₁はメチレン基又はアルキレン基、Sは糖化合物からアノメリック水酸基以外の1個の水酸基が除かれた糖残基を示す。)で表される重合性糖エステルとアクリロイルピペリジンを、重合開始剤存在下にラジカル重合させる、請求項1~3のいずれかに記載の共重合体の製造方法。

【請求項5】 モノマー総量100モル%に基づいて、一般式(3)の化合物0.1~99.9モル%、アクリロイルピペリジン99.9~0.1モル%からなるモノマー混合物を、重合開始剤存在下にラジカル重合させる、請求項4に記載の製造方法。

【請求項6】 請求項1~3のいずれかに記載の共重合体を用いて、蛋白質を精製する方法。

【請求項7】 請求項6に記載の精製方法であって、i)蛋白質を含む試料と請求項1~3のいずれかに記載の共重合体を1~5°C程度の条件下混合し、ii)混合物の温度を7~15°C程度に上昇させ、沈殿物と溶液とに分離し、iii)得られた沈殿物に、1~5°C程度の条件下、脱離剤を加えて蛋白質を解離することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は新規な温度刺激応答

性高分子化合物とその製造方法及びそれを利用したアフィニティ沈殿によるタンパク精製に関する。

【0002】

【従来の技術】蛋白質の精製にはそのリガンドを担体に結合したアフィニティカラムクロマトグラフィーが広く利用されている。しかし、その精製工程においては長時間を要し、また大量の溶出液を必要とする。近年、生理活性物質を機能性高分子で修飾したハイブリッド技術がめざましく進展してきている。これにより、生理活性物質の機能変換、新機能の付加が可能となった。そのひとつとして可溶不溶可逆性高分子を利用したアフィニティ沈殿法による有用物質の精製が挙げられる (J. Fermen t. Bioeng., 68, 32-36, 1989, Biomaterial, 11, 625-639, 1990, Biomaterial, 11, 631-634, 1990 Bioconju gate Chem., 4, 509-514, 1993, Biotechnol. Bioeng., 40, 1381-1387, 1992)。これまでの研究からPoly N-acryloyl piperidine (pAP)にマルトースを導入したpAP-Maltose (マルトースのアノメリック位に重合性基が結合したもの)は、レクチンやα-グルコシダーゼに対して強い親和性を示し、アフィニティ沈殿により高度にタンパクを精製することが明らかになっている (K. Hoshino et al., Biotechnol. Bioeng., 60, 568-579, 1998)。

【0003】しかしながら、上記高分子では、アノメリック水酸基を介して糖質がポリマー鎖に結合した構造を

有しているため、各種グリコシダーゼを特異的に認識することができなかった。

【0004】このように、糖をリガントとするアフィニティ吸着体の調整方法は、主に糖のアノマー位を化学修飾した重合性糖質誘導体との共重合体を合成する方法がとられている。そのためそれらの吸着体を用いたアフィニティ沈殿法は、糖のアノマー位のグリコシル結合を特異的に認識するレクチン類および糖加水分解酵素などに対して有効である。しかし、糖のアノマー位以外の水酸基が関係する糖質間の結合を認識するレクチン類および糖加水分解酵素などの精製には、これまでの重合性糖質誘導体では不可能であった。また、N-イソプロピルアクリラミドと重合性糖エステルとの共重合体からなる温度感受性ポリマーも報告されているが（特開2000-212228）、沈殿が生じてくる温度が30°C以上と高く不安定なタンパクの精製には適していない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、糖質間の結合の中でアノメリック水酸基以外の水酸

基が結合に関係している糖質を認識する物質と親和性があり（例えば、グリコシド結合の非還元末端側の糖質を認識する物質と親和性があり）、アノメリック水酸基以外の水酸基を介して、ポリマー鎖に結合した構造の糖リガンドを有した、より低温に疊点を有する温度感受性ポリマー及びその製造方法とそれを利用した蛋白質の精製方法を提供することにある。

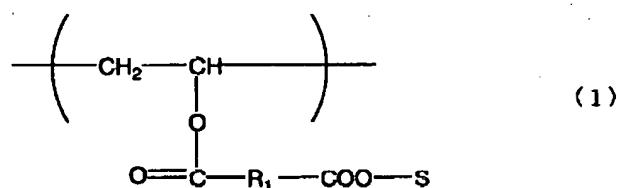
【0006】

【問題を解決するための手段】本発明者は、上記の目的を達成すべく銳意研究を重ねた結果、ジカルボン酸ビニルエステルに糖が結合した重合性の糖エステルとアクリロイルビペリジンとを共重合させることにより、10°C辺りに疊点を持つ共重合体を合成することに成功して、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は以下の発明を提供するものである。

【0007】項1. 下記一般式(1)

【0008】

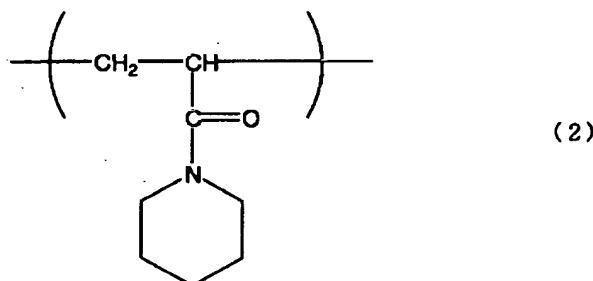
【化4】



【0009】(式中、R₁はメチレン基又はアルキレン基、Sは糖化合物からアノメリック水酸基以外の1個の水酸基が除かれた糖残基を示す)で表される構造単位および下記一般式(2)

【0010】

【化5】



【0011】で表される構造単位からなる共重合体。

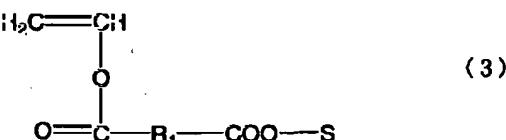
【0012】項2. 一般式(1)で表される構造単位を0.01～99.99モル%、及び一般式(2)で表される構造単位を99.99～0.01モル%含有する項1に記載の共重合体。

【0013】項3. 一般式(1)中の糖化合物が、单糖類、オリゴ糖類、多糖類及びその部分加水分解物並びにそれらの誘導体から選択される化合物である、項1又は2に記載の共重合体。

【0014】項4. 下記一般式(3)の化合物

【0015】

【化6】



【0016】(式中、R₁はメチレン基又はアルキレン基、Sは糖化合物からアノメリック水酸基以外の1個の水酸基が除かれた糖残基を示す。)で表される重合性糖エステルとアクリロイルビペリジンを、重合開始剤存在下にラジカル重合させる、請求項1～3のいずれかに記載の共重合体の製造方法。

【0017】項5. モノマー総量100モル%に基づいて、一般式(3)の化合物0.1～99.9モル%、アクリロイルビペリジン99.9～0.1モル%からなるモノマー混合物を、重合開始剤存在下にラジカル重合させる、項4に記載の製造方法。

【0018】項6. 項1～3のいずれかに記載の共重合体を用いて、蛋白質を精製する方法。

【0019】項7. 請求項6に記載の精製方法であつて、

i)蛋白質を含む試料と項1～3のいずれかに記載の共重合体を1～5°C程度の条件下混合し、

ii)混合物の温度を7～15°C程度に上昇させ、沈殿物と溶液とに分離し、

iii) 得られた沈殿物に、1~5°C程度の条件下、脱離剤を加えて蛋白質を解離させる
ことを含む方法。

【0020】

【発明の実施の形態】一般式(3)の化合物

本発明の共重合体の合成に用いる重合性の糖エステルは、前記一般式(3)で表される。R₁としては特に制限はないが、通常、エチレン基又は炭素数2~18の直鎖又は分岐状のアルキレン基、好ましくは炭素数2~8の直鎖または分岐アルキレン、例えば、エチレン、トリメチレン、プロピレン、テトラメチレン、ヘキサメチレン、オクタメチレン基などが挙げられる。好ましくは、テトラメチレンである。

【0021】また、糖残基Sを与える糖化合物も特に制限はないが、単糖類、オリゴ糖類、多糖類及びその部分加水分解物ならびにそれらの誘導体（例えば、アミノ糖、配糖体、核酸、糖アルコール、ウロン酸、アルコルビン酸等）が例示できる。

【0022】例えば、単糖類としては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース等のヘキソース、アラビノース、キシロース、リボース等のペントースが例示できる。

【0023】オリゴ糖類としては、スクロース、マルトース、セロビオース、ラクトース、トレハロース等の二糖類、ラフィノース、マルトトリオース等の三糖類、マルトテトラオース、マルトペンタオース、サイクロデキストリン等が例示できる。

【0024】多糖類およびその部分加水分解物としては、デンプン、グリコーゲン、セルロース、キチン、キトサン、マンナン、フルラン、カードラン、キシラン、ガラクトマンナン、グルコマンナン、デキストラン、ヒアルロン酸等の多糖およびそれらの部分加水分解物（例えば、デキストリン）などが挙げられる。

【0025】アミノ糖としては、グルコサミン、ガラクトサミンやノイロラミン酸等のシアル酸等が、配糖体としては、アルブチン、サリシン、ポブリン等が、核酸としては、アデノシン、ウリジン、チミジン、グアノシン、シチジン、2'-デオキシシチジン、2'-デオキシアデノシン、2'-デオキシグアノシン等が例示できる。

【0026】好ましくは、単糖類や二糖類である。より好ましくは、グルコース、マンノース、ガラクトース、マルトース、トレハロース）である。

【0027】これら糖化合物は、D体でもL体でもよいし、両者の混合物でもよい。好ましくは、D体のものである。

【0028】「アノメリック水酸基以外の水酸基」としては、上記糖化合物中、アノメリック炭素に結合している水酸基以外の水酸基を意味する。即ち、アノメリック炭素とは、アルドースの場合には、アルデヒド基中の炭

素(C-1)をいい、ケトースの場合には、ケトン基中の炭素(C-2)をいう。従って、「アノメリック水酸基以外の水酸基」とは、炭素数6のアルドースの場合には、C-2、C-3、C-4及びC-6に結合している水酸基、炭素数6のケトースの場合には、C-1、C-3、C-4及びC-5に結合している水酸基となる。

【0029】好ましい一般式(3)の化合物としては、R₁がテトラメチレンであり、Sが糖化合物が単糖類または二糖類（より好ましくは、グルコース、マンノース、ガラクトース、マルトース、トレハロース）であって、6位或いは6'位の水酸基に重合性基を配するものである。

【0030】本発明で用いられる重合性の糖エステル（一般式(3)の化合物）は、ジカルボン酸ビニルエステルと糖化合物とを化学的にエステル結合させるか、あるいは加水分解酵素（もしくは該酵素を産生する微生物等）を用いて酵素化学的に（もしくは発酵的に）結合させることにより合成することができる。

【0031】酵素化学的にエステル結合させる場合には、酵素としてプロテアーゼやリバーゼ、特に放線菌由来やバチルス属由来のプロテアーゼやアルカリゲネス属やブタ脾臓由来のリバーゼが好ましく用いられる。または、各種由来のエステラーゼを用いてもよい。

【0032】化学的にエステル結合させる場合には、例えば、塩基触媒を用いた方法 (J. Org. Chem., 53, 449 (1988)) に記載の方法によって合成し、例えばシリカゲル等のカラムで分離し得ることができる。

【0033】本発明で用いる重合性アクリル酸においてはアクリロイルピペリジンが挙げられる。

【0034】本発明の共重合体

本発明における一般式(3)の化合物及びアクリロイルピペリジンの混合比としては、モノマー総重量100モル%に基づいて、一般式(3)の化合物が0.1~9.9モル%、アクリロイルピペリジンが99.9~0.1モル%、好ましくは、一般式(3)の化合物が1~50モル%、アクリロイルピペリジンが50~99モル%程度の割合で混合する。このような範囲内であれば、所望の共重合体（即ち、一般式(1)で表される構造単位が共重合体中に0.01~99.99モル%、好ましくは0.1~20モル%含有される）が得られる。

【0035】本発明の共重合体は、例えば下記の方法により製造することができる。即ち、上記の糖エステル（一般式(3)の化合物）およびアクリロイルピペリジンを混合し、該混合物をラジカル重合開始剤の存在下、加熱等により重合反応を開始させることによって合成できる。好ましくは、糖エステル（一般式(3)の化合物）およびアクリロイルピペリジンを溶媒中に溶解し、該混合物をラジカル重合開始剤の存在下、加熱等により重合反応を開始させることによって合成するのがよい。

【0036】溶媒としては、重合反応に関与せず、原料

モノマーが溶解可能であれば、特に限定されないが、DMSO、DMF、ピリジンやメタノール、エタノール、t-ブチルアルコール等のアルコール類、水等が例示でき、好ましくは、t-ブチルアルコールである。溶媒と該モノマー混合物との混合比は、得られる共重合体の要求物性に基づいて任意の範囲で混合できるが、通常は、モノマー混合物1重量部に対して、溶媒を1～100重量部の範囲で混合するのがよい。この範囲を越えると分子量が低下するおそれがある。

【0037】ラジカル重合開始剤としては、特に限定されないが、アゾイソブチルニトリル(Azoisobutylnitrile(AIBN))、アゾビスアミジノプロパン塩酸塩(Azobisis(2-amidinopropane)·2HCl)等のアゾ化合物や、フェントン試薬等が例示でき、好ましくは、アゾ化合物、特にAIBNである。ラジカル重合開始剤の使用量としては、得られる共重合体の要求物性に応じて任意の範囲で用いられるが、通常はモノマー総量100モル%の0.1～2モル%程度である。

【0038】重合は、例えば、上記各モノマー及び溶媒を均一に混合したモノマー溶液に、ラジカル重合開始剤を添加、混合し、50～80°Cで1時間以上行わせる。好ましくは、65°C程度で2～24時間程度反応させることにより合成される。モノマー溶液は、高分子量のポリマーを得るために脱気することが好ましく、また、ラジカル重合開始剤を加えた後も同様である。重合反応中、攪拌することが好ましい。

【0039】反応終了後、溶媒を除去し、残渣を蒸留水等に溶解させる。得られた共重合体は、温度応答性があるので、7～15°C程度の条件にすることによって、沈殿物として回収することができる。

【0040】更に必要に応じて、例えば有機溶剤で洗浄や、透析等によって精製してもよい。

【0041】本発明の共重合体は、前記一般式(1)で表される構造単位および前記一般式(2)で表される構造単位からなり、構造単位(1)を0.01～99.9モル%、好ましくは0.1～20モル%で含有する(即ち、構造単位(2)を0.01～99.9モル%、好ましくは80～99.9モル%)。低温で沈殿を生じる温度刺激応答性ポリマーを得るために、構造単位(2)を有する共重合体を80～99.9モル%含む(即ち、構造単位(1)を0.1～20モル%)ことが望ましい。

【0042】本発明の共重合体の分子量には特に制限はないが、好ましくは数平均分子量で3000～600000、好ましくは、10000～100000である。分子量は、共重合体の使用目的に応じて適当な大きさのものを選択することができる。また、重合性糖エステルの組成比率を多くすることによって、タンパクの吸着量を増やすことができる。

【0043】本発明の共重合体は、ランダム構造を有し

ていてもよいし、ブロック構造を有していてもよい。上記製造方法は、ランダム構造の共重合体を製造する方法であるが、ブロック共重合体の製造についても、上記製法を参照し、常法に従い、製造することができる。

【0044】本発明の共重合体は、糖分岐構造を有する温度刺激応答性ポリマーであるため、温度刺激応答性の機能性材料として使用することができる。即ち、本発明の共重合体は、5°C程度以下では、水溶液として存在するが、7°C程度以上になると沈殿する特性を有している。従って、本発明の温度刺激応答性ポリマーは、物質精製材料、ブラックデリバリーシステム制御材料等として用いることができ、各用途に応じて適宜、通常用いられる他の成分を含有させてもよい。

【0045】本発明の共重合体を用いた蛋白質の精製方法

本発明の共重合体を用いて、蛋白質、例えば、熱に不安定な蛋白質を精製することができる。具体的には、糖類に親和性のあるタンパク質、具体的には、アノメリック水酸基以外の水酸基が糖質間の結合に関与している糖質(例えば、1,6グリコシド結合を有する非還元末端側の糖質)に親和性のあるタンパク質や遊離のアノメリック水酸基に親和性のある蛋白質、例えば、グリコシダーゼ(例えば、デキストラナーゼ、フルラナーゼ、イソアミラーゼ等の1,6-グルコシダーゼ)や糖輸送タンパク(例えば、グルコース輸送担体)、レクチン等が本発明の共重合体に用いて精製できる。

【0046】具体的には、

- i) 蛋白質を含む試料と本発明の共重合体を1～5°C程度の条件下混合し、
- ii) 混合物の温度を7～15°C程度に上昇させ、沈殿物と溶液とに分離し、
- iii) 得られた沈殿物に、1～5°C程度の条件下、脱離剤を加えて蛋白質を解離させる。

【0047】i) 蛋白質を含む試料と本発明の共重合体を、水溶液に溶解させる。水溶液としては、蛋白質を含む試料を溶解できるものであれば特に限定されず、例えば、酢酸やリン酸等のバッファーが例示できる。

【0048】蛋白質を含む試料と本発明の共重合体の配合比については、共重合体中の糖化合物の含有量に依存するが、例えば、蛋白質1g当たり、共重合体を10～500g、好ましくは50～200gの割合で混合する。

【0049】蛋白質を含む試料と本発明の共重合体を混合し、共重合体が水中に溶解する温度である1～5°C程度の条件下静置させることによって所望の蛋白質を本発明の共重合体に結合させる。好ましくは、攪拌した方がよい。

【0050】ii) 次に、共重合体が不溶になる7～15°C程度に水溶液の温度を上げることによって、蛋白質が結合している共重合体は不溶化させる。不溶化した共重

合体を例えれば、遠心分離によって、沈殿物を回収する。

【0051】iii) 得られた沈殿物に、例えば、蒸留水、緩衝液（例えば、酢酸バッファー（pH 5.5）など）を添加し、共重合体が溶解できる温度、即ち、1～5°C程度に温度を下げ、脱離剤を加えて共重合体から所望の蛋白質を解離させる。解離剤としては、各種糖化合物、塩が例示できる。

【0052】糖化合物としては、单糖類、オリゴ糖類、多糖類およびその部分加水分解物並びにそれらの誘導体（例えば、アミノ糖、配糖体、核酸、糖アルコールやウロン酸、アルコルビン酸等）が例示できる。これらの具体例としては、上記の通りである。好ましくは、グルコース、マルトトリオース、フルラン等が挙げられる。

【0053】糖化合物の濃度としては、特に限定されないが、0.01～10%、好ましくは、0.05～6%程度になるような濃度がよい。

【0054】塩としては、NaCl、KCl等が例示できるが、NaClが好ましい。使用する濃度としては、0.1～2M、好ましくは、0.5～1.5M程度である。

【0055】沈殿物に対するこれら解離剤の量は適宜設定される。

【0056】解離は、攪拌する方がよい。

【0057】また、解離した蛋白質は、上清を集めることによって得ることができる。また、所望によりHPLC等によって精製してもよい。

【0058】上記精製方法は、バッチ法によっておこなうのが好ましい。

【0059】

【実施例】以下、この発明の実施例を示し、さらに詳しくこの新規温度刺激応答性高分子とその製造方法及びそれを利用したアフィニティ沈殿によるタンパク精製について説明するが、これらは単なる例示であって、本発明の制限をなんら限定するものではない。

【0060】参考例1 6-O-vinyladipoyl-D-glucoseの合成

グルコース36g、アジピン酸ジビニル305gを含むDMF溶液1lに、ビオブレーザー240gを添加し、35°C、130rpmにて2週間攪拌した。酵素反応液を沪過して酵素粉末を除去した後、反応液を減圧濃縮しDMFを除去した。シリカゲル100gを充填したカラムに得られた濃縮液を添加し、クロロホルム：メタノール=8:1で溶出し、生成物を集めアセトンから標記6-O-ビニルアジポイル-D-グルコースの結晶を得た。無色粉末結晶45g（収率68%）。

【0061】実施例1：グルコースエステルーアクリロイルピペリジン共重合体の合成

グルコースエステルーアクリロイルピペリジン共重合体の合成は、以下のようにして行った。セパラブルフラスコ内でアクリロイルピペリジン(AP)5g(36ミリモル)および6-O-vinyladipoyl-D-glucose(VP)0.122g(0.36ミリモル)をtert-ブタノール250mlに溶解させた後、窒素ガスにより脱気し65°Cにインキュベートした。この溶液にAIBN 75mg(0.46ミリモル)を添加し、65°Cで12時間重合させた。この反応の後、ロータリーエバボレーターを用いてtert-ブタノールを除いた後、残渣を蒸留水200mlに溶解した。生成した高分子は温度応答を示すので、遠心分離操作(6,000×g, 10分, 10°C)により沈殿として回収した。また、この高分子は先の沈殿を透析チューブ(Seamless Cellulose Tubing, Size 24, Wako)に入れ蒸留水にて24時間以上透析することにより精製した。さらに、透析チューブ内の高分子溶液を凍結乾燥し、得られた高分子化合物(共重合体)をpAP-VG1(ポリマーC)とした。

【0062】上記と同様に、アクリロイルピペリジンと6-O-vinyladipoyl-D-glucoseの配合比を代えて共重合体を得た。

【0063】得られた各共重合体の特性を以下の表1に示す。

【0064】

【表1】

共重合体の特性						
ポリマー	仕込み比 AP:VG	ポリマー中の 共重合比 AP/VG (mol/mol)	ポリマーに 結合した グルコース量 (mol·glucose/ g polymer)	Mw ^{a)}	LCST ^{b)} (°C)	Recovery ratio ^{c)} (%)
A	2:1	20	2.85 × 10 ⁴	4.29 × 10 ⁴	5.5	91.0
B	9:1	39	1.60 × 10 ⁴	6.46 × 10 ⁴	4.9	99.2
C	99:1	210	3.12 × 10 ³	8.45 × 10 ⁴	4.9	95.0

a) GPC から求めた平均分子量

b) 温度刺激応答性の評価

高分子希薄溶液の温度変化に対する応答は、分光光度計を用いて470 nmにおける吸光度を測定することにより評価した。

c) 40000gで10°C、10分間遠心分離後のポリマーの回収率

【0065】実施例2：トレハロースエステルーアクリロイルピペリジン共重合体の合成
トレハロースエステルーアクリロイルピペリジン共重合

体の合成は、アクリロイルピペリジン5g(36ミリモル)と、参考例1と同様にして合成した6-O-vinyladipoyl-D-trehalose 0.175g(0.36ミリモル)を用い

て、実施例1と同様の方法で合成した。

【0066】実施例3：マンノースエステルーアクリロイルピペリジン共重合体の合成

マンノースエステルーアクリロイルピペリジン共重合体の合成は、アクリロイルピペリジン5g(3.6ミリモル)と、参考例1と同様にして合成した6-O-vinyladipoyl-D-mannose 0.122g(0.36ミリモル)を用いて、実施例1と同様の方法で合成した。

【0067】実施例4：マルトースエステルーアクリロイルピペリジン共重合体の合成

マルトースエステルーアクリロイルピペリジン共重合体の合成は、アクリロイルピペリジン5g(3.6ミリモル)と、参考例1と同様にして合成した6-O-vinyladipoyl-D-maltose 0.175g(0.36ミリモル)を用いて、実施例1と同様の方法で合成した。

【0068】実施例2～4で得られた共重合体の特性を以下に示す。

【0069】

【表2】

実施例	仕込み比 AP:一般式(3) の各化合物 モル比	ポリマー中の 共重合比 AP/一般式 (3)の各 化合物 (mol/mol)	Mw ^a	LCST ^b (℃)	Recovery ratio ^c (%)
2	99:1	240	4.52×10 ⁴	4.9	98.0
3	99:1	200	7.33×10 ⁴	4.8	99.5
4	99:1	230	6.42×10 ⁴	5.0	97.0

a) GPC から求めた平均分子量

b) 温度刺激応答性の評価

高分子希薄溶液の温度変化に対する応答は、分光光度計を用いて470 nmにおける吸光度を測定することにより評価した。

c) 40000Gで10℃、10分間遠心分離後のポリマーの回収率

【0070】試験例1 温度刺激応答性の評価

実施例1で得られたポリマーAについて、温度刺激応答性(温度に対する溶解性の応答)の評価を行った。即ち、分光光度計を用いて470 nmにおける吸光度を測定することにより評価した。使用した高分子溶液の濃度は3.0 mg/mlである。

【0071】結果を図1に示す。図中のTransmittanceが1の時、その高分子溶液は完全に透明な液体であるが0の時は完全に白濁していることを示す。従って、本高分子を含む水溶液は、4.5℃以下で完全に水に可溶状態、9.0℃以上で完全に不溶化した。また、この温度応答は完全に可逆的に応答し、pH 2～10の範囲でその応答範囲は変化しないことがわかった。

【0072】実施例5：蛋白質の精製

i) pullulanase(プルラナーゼ)の粗酵素液(終濃度0.25mg蛋白質/ml)と実施例1で得られたポリマーAであるpAP-VG(終濃度50mg/ml)を酢酸バッファーpH 5.0に溶かし、4℃で30分間放置した。

【0073】ii)次いで、ポリマーが不溶になる10℃で12,000rpm、10分間の遠心分離を行い、沈殿物を回収した。

【0074】iii)沈殿物に0.1M酢酸バッファーを10ml添加し、これに脱離剤(グルコース)を0.1Mの濃度となるように添加し、4℃、30分間放置後、12,000rpm、10分間遠心分離を行い、上清を回収した。

【0075】蛋白質量はHPLCにより測定した。精製したpullulanaseはSDS-PAGEにより確認した。

【0076】HPLC

Pullulanaseの蛋白質量は、HPLCを用いて定量した。具体的には、Shodex Asahipak GS-320とGS-710を連結させた2連のカラムを使用した。また、キャリーとして水を使用し、1 ml/min 30℃の条件で紫外可視分光光度計検出器を用い280 nmの波長を測定することにより定量した。標準物質として他のクロマトグラフィー法で精製したPullulanaseを標準とした。

【0077】SDS-PAGEの分析条件

SDS-PAGEはLaemmli法(U. Laemmli, Nature, 227, 680-685, 1970)により行った。使用した電気泳動ゲルはATTO製の5-20%グラジェントゲル(NPG-520L)を使用した。また、蛋白質の標準マーカーとしてProtein Molecular Weight Markers High-Range (Seikagaku Co.)を、また、染色は、Silver stain II Kit Wako (Wako Co.)を使用した。結果を図2に示す。レーン1と4はマーカータンパク、2は未精製pullulanase、3はアフィニティ沈殿後の酵素を示している。未精製pullulanaseには多くの不純なタンパクが含まれているが、精製後はpullulanase(分子量118,000)のバンドのみが確認された。

【0078】また、粗酵素液と精製した酵素溶液のPullulanaseの活性は、基質としてPullulanを用い、酢酸緩衝液(0.1 N, pH 6.0)30℃の条件下で粗酵素溶液あるいは精製pullulanase溶液を添加し30分間酵素反応を行うことにより測定した。活性はSomogyi-Nelson法により生成したMaltotrioseを定量し、その酵素活性1Uは1分間に1μmolの還元糖を生成する酵素量とした。結果を表3に示す。

【0079】

【表3】

アフィニティ沈殿により精製した pullulanase の酵素活性

サンプル	比活性 (unit/mg protein)	精製倍率
粗酵素液	1.39	1
アフィニティ沈殿後	44.5	32

【0080】表3に示したように1回のアフィニティ沈殿処理により32倍に精製することができた。

【0081】試験例3 種々の脱離剤の検討

脱離剤の検討を行った。即ち、pullulanaseが吸着したpAP-VG（実施例1のポリマーA）からの9種類の脱離剤の効果を示した。具体的には、プルナラーゼが0.25mg/gの割合で吸着しているポリマー0.5gを、以下の濃度の脱離剤10mlに添加し、4°C、30分間放置後、遠心分

離し、上清と沈殿を回収した。脱離したプルナラーゼの量はHPLCで測定した。結果を表4に示す。

【0082】Tween80やpH2のGlycine-HClバッファーでは酵素の脱離は起こらなかったが、糖化合物、特に、グルコース、マルトトリオース、ブルランを使用した場合、効率よく酵素が脱離することが分かった。

【0083】

【表4】

脱離剤水溶液	脱離したプルナラーゼ濃度 ^{a)} (μg/ml)
0.1M グルコース	146
0.1M マルトース	16.3
0.1M メチル-α-D-グルコピラノシド	9.03
0.1M マルトトリオース	298
0.5 g/L デキストリン	9.85
0.5 g/L デキストラン	23.1
0.5 g/L ブルラン	207
1.0M NaCl	97.7
1.0M KCl	9.72
5% Tween 80	0
グリシン-HCl緩衝液 (pH2.0)	0

a) プルナラーゼの吸着濃度 (250 μg/ml)

【0084】試験例4 各ポリマーへの蛋白質の吸着量 実施例1で得られたポリマーA、Bに対するpullulanaseの吸着量(4°C)を測定した。具体的には、各プルナラーゼ濃度溶液に0.5gの各ポリマーを添加、混合し、結果を図3に示す。その結果、グルコース残基の含有量に応じて吸着量も変化し、ポリマーAはBに比べて約2倍のpullulanaseを吸着した。さらにPolymer AについてLangmuir型等温吸着式から吸着係数を求めたところ $5.20 \times 10^{-5} M^{-1}$ となりPullulanaseはpAP-VGに対して強く吸着することが分かった。

【0085】

【発明の効果】本研究ではアノメリック水酸基以外の水酸基、例えば、糖質の6位に重合性置換基を導入した重合性糖エステルを用いて温度刺激応答性高分子のモノマーであるアクリロイルペリジンと共に重合することにより、糖質の6位を認識する蛋白質をアフィニティ沈殿法

により短時間でしかも少量のバッファーで精製することが可能となった。

【0086】本ポリマーは1~5°C程度で水溶液中に溶解しており、7~15°C程度で沈殿となることから、低温で処理する必要のある酵素タンパクの精製には適した方法である。

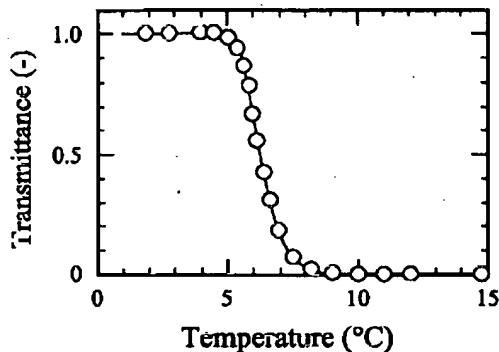
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、実施例1で得られたポリマーAについて、温度刺激応答性(温度に対する溶解性の応答)の評価を示す。横軸に温度、縦軸に透過率を示す。

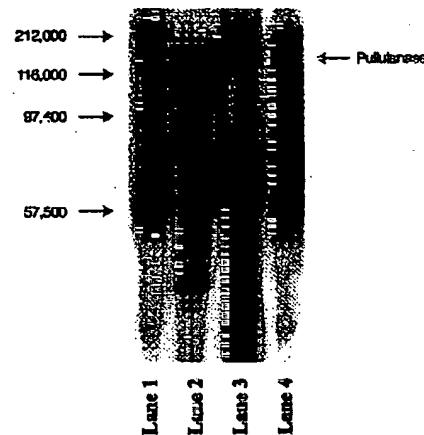
【図2】図2は、実施例5における精製前とアフィニティ沈殿後のSDS-PAGEを示した。レーン1と4はマーカータンパク、2は未精製pullulanase、3はアフィニティ沈殿後の酵素を示す。

【図3】図3は、4°Cにおける実施例1で得られたポリマーA、Bに対するpullulanaseの吸着量を示す。

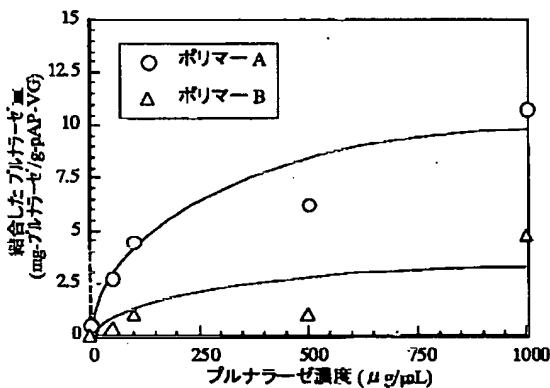
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ 識別記号
 C 08 F 220/54
 G 01 N 30/88
 // G 01 N 30/48

(71) 出願人 598121444
 常盤 豊
 茨城県土浦市桜ヶ丘町46-12
 (71) 出願人 501078247
 星野 一宏
 富山県富山市五福町3190
 (72) 発明者 星野 一宏
 富山県富山市五福町3190
 (72) 発明者 幸本 和明
 富山県富山市五福町3190

F I (参考)
 C 08 F 220/54
 G 01 N 30/88 J
 30/48 R

(72) 発明者 常盤 豊
 茨城県つくば市東1丁目1番3 経済産業
 省産業技術総合研究所生命工学工業技術研
 究所内
 (72) 発明者 北川 優
 滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 株式会
 社東洋紡総合研究所内
 (72) 発明者 楽 隆生
 大阪府高槻市中川町5-21 甲南化工株式
 会社内

(10) 02-249523 (P2002-249523A)

F ターム(参考) 4D017 AA09 BA03 CA13 CB01 CB10
DA01 DB02
4G066 AB12A AB26A AD09B AD11B
AD15B AD20B CA54 DA07
EA02 FA07 FA37 GA11
4H045 AA20 EA61 GA26
4J100 AG08P AM19Q BA03P BA15P
BC53P CA04 FA03 JA16
JA50